

de transferts d'électrons impliqués dans de tels systèmes. Les recherches dans ce domaine sont assez délicates, car elles impliquent que les deux protéines en cause soient présentes simultanément dans la solution. Hill et coll. [30] ont pu montrer que le cytochrome *c* promouvait la réponse du cytochrome *b5*. Le concept basé sur la nature dynamique des complexes [protéine - protéine] a été également utilisé pour interpréter les résultats obtenus dans le cas du complexe [cytochrome *c* - plastocyanine], dans lequel les deux molécules de protéine sont liées de façon covalente. La décroissance observée pour la réponse à l'électrode du complexe covalent résulterait des contraintes imposées par les liaisons aux mouvements des deux protéines formant le complexe covalent.

## Références

- [1] R.C. Prince, S.J.G. Linkletter, P.L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 635, 132.
- [2] L. Griggio, S. Pinamonti, *Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Arti*, **1965-1966**, 124, 15 ; S.R. Betso, M.H. Klapper, L.B. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 8197 ; F. Scheller, M. Jänchen, J. Lampe, H.J. Prümke, J. Blanck, E. Palecek, *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 412, 157 ; B.A. Kuznetsov, G.P. Shumakovich, N.M. Messtechkina, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1977**, 4, 512 ; J. Haladjian, P. Bianco, P.A. Serre, *J. Electroanal. Chem.*, **1980**, 106, 397 ; F. Scheller, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1977**, 4, 490.
- [3] E.F. Bowden, F.M. Hawkridge, P.M. Blount, *Treatise Electrochem.*, **1982**, 10, 398.
- [4] M.J. Eddowes, H.A.O. Hill, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1977**, 3154.
- [5] L.H. Guo, H.A.O. Hill, *Advanc. Inorg. Chem.*, **1991**, 36, 341, et références incluses.
- [6] I. Taniguchi, M. Iseki, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, 175, 341, et références incluses.
- [7] M.J. Eddowes, H.A.O. Hill, K. Uosaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 7113.
- [8] P. Yeh, T. Kuwana, *Chem. Lett.*, **1977**, 1145.
- [9] E.F. Bowden, F.M. Hawkridge, H.N. Blount, *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, 161, 355.
- [10] M.A. Harmer, H.A.O. Hill, *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, 189, 229.
- [11] K. Niki, T. Yagi, H. Inokuchi, K. Kimura, *J. Electrochem. Soc.*, **1977**, 124, 1889 ; K. Niki, T. Yagi, H. Inokuchi, K. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 3335.
- [12] P. Bianco, J. Haladjian, *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, 545, 86.
- [13] K. Fan, H. Akutsu, Y. Kyogoku, K. Niki, *Biochemistry*, **1990**, 29, 2257, et références incluses.
- [14] P. Bianco, J. Haladjian, *Biochimie*, **1994**, 76, 605, et références incluses.
- [15] C. Moreno, A. Capos, M. Teixeira, J. Le Gall, M.I. Montenegro, I. Moura, C. van Dijk, J.G.J. Moura, *Eur. J. Biochem.*, **1991**, 202, 385.
- [16] M.J.F.M. Verhagen, A.J. Pierik, R.B.G. Wolbert, L.F. Mallée, W.G.B. Voorhorst, W. R. Hagen, *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 225, 311, et références incluses.
- [17] I. Mus-Veteau, A. Dolla, F. Guerlesqui, F. Payan, M. Czjek, R. Haser, P. Bianco, J. Haladjian, B.J. Rapp-Glies, J.D. Hall, G. Voordouw, M. Bruschi, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 16851.
- [18] M. Bruschi, M. Loutfi, P. Bianco, J. Haladjian, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1984**, 120, 384 ; M. Loutfi, F. Guerlesqui, P. Bianco, J. Haladjian, M. Bruschi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1989**, 159, 670.
- [19] E. Stellwagen, *Nature*, **1978**, 275, 73.
- [20] P. Bianco, J. Haladjian, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1981**, 8, 239.
- [21] H.L. Landrum, R.T. Salmon, F.M. Hawkridge, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 3154.
- [22] F.A. Armstrong, H.A.O. Hill, N.J. Walton, *FEBS Letter*, **1982**, 145, 241.
- [23] F.A. Armstrong, *Structure and Bonding*, **1990**, 72, 137 ; F.A. Armstrong, *Perspectives on Bioinorg. Chem.*, **1991**, 141, et références incluses.
- [24] A. Manjaoui, J. Haladjian, P. Bianco, *Electrochim. Acta*, **1990**, 35, 177.
- [25] R.W. Murray, in « *Electroanalytical Chemistry* », **1984**, Marcel Dekker, New York, p.191 ; R.W. Murray, A.G. Ewing, R.A. Durst, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 379A.
- [26] P. Bianco, J. Haladjian, S. Giannandrea-Derocles, *Electroanalysis*, **1994**, 6, 67.
- [27] P. Bianco, A. Taye, J. Haladjian, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 377, 299.
- [28] Z. Salamon, G. Tollin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, 294, 382 ; P. Bianco, J. Haladjian, *Electrochim. Acta*, **1994**, 39, 911.
- [29] P. Bianco, J. Haladjian, M. Bruschi, F. Guerlesquin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1992**, 189, 633.
- [30] S. Bagby, P.D. Barker, L.H. Guo, H.A.O. Hill, *Biochemistry*, **1990**, 29, 3213.

## Analyse des possibilités de transferts électroniques directs entre des électrodes et des enzymes

Hélène Durliat

Pendant longtemps, il a été admis que le transfert électronique direct entre une électrode et une enzyme était impossible. Les raisons invoquées tenaient d'une part dans les possibilités de dénaturation de la biomolécule dans la double couche électrochimique, et d'autre part dans la distance importante entre le centre redox de l'enzyme, isolé par une couche protéique épaisse, et la surface du conducteur électronique.

Depuis une vingtaine d'années, grâce à l'affinement des méthodes électrochimiques, au développement des tech-

niques de modification de surface et à de nombreux résultats obtenus sur des molécules biologiques comme le cytochrome *c*, des ferrédoxines, des plastocyanines, l'attitude des scientifiques s'est modifiée et, à l'heure actuelle, une trentaine d'enzymes a fait l'objet d'études électrochimiques approfondies. Le but de l'article est de recenser les travaux effectués dans ce domaine en insistant sur quelques méthodologies qui permettent d'envisager plusieurs types d'applications.

## 1. Revue bibliographique

Le premier exemple du transfert d'électrons avec une enzyme est sans doute celui de l'étude électrochimique de la laccase, catalyseur de la réduction de l'oxygène, effectuée par Tarasevich en 1978 sur une électrode de carbone [1]. La même année, Kulys [2] publie des résultats sur le transfert avec une lactate déshydrogénase de type cytochrome  $b_2$ . Les différentes enzymes étudiées depuis cette époque sont rassemblées dans le tableau I.

Enzyme	Réactions	Références
laccase	$O_2 + 4H^+ + 4e \rightarrow 2H_2O$	1
cytochrome $b_2$	lactate $\rightarrow$ pyruvate + $2H^+ + 2e$	2
peroxydase	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e \rightarrow 2H_2O$	3
cytochrome $b_2$	(électrode) hème oxydé + $e \rightarrow$ hème réduit FMN oxydé + $e \rightarrow$ FMN réduite	4
hydrogénase	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e$	5
glucose oxydase	(électrode) GOD oxydé + $e \rightarrow$ GOD intermédiaire GOD intermédiaire + $e \rightarrow$ GOD réduite	6,4
p.crésolméthyl- hydroxylase	hydrogénase.p.crésol + $H_2O \rightarrow$ p.hydroxybenzaldéhyde + $4H^+ + 4e$	7
méthylamine déshydrogénase	méthylamine $\rightarrow$ formaldéhyde + $NH_3 + 2H^+ + 2e$	8
flavocytochrome c 552	$HS^- \rightarrow S + H^+ + 2e$	9
succinate déshydrogénase	succinate $\rightarrow$ fumarate + $2H^+ + 2e$	10
fumarate réductase	fumarate + $2H^+ + 2e \rightarrow$ succinate	11
fructose déshydrogénase	D-fructose $\rightarrow$ 2 céto D-fructose + $2H^+ + 2e$	12
alcool déshydrogénase	éthanol $\rightarrow$ acétaldéhyde + $2H^+ + 2e$	13
gluconate déshydrogénase	gluconate $\rightarrow$ 2-cétogluconate + $2H^+ + 2e$	14
cellobiose déshydrogénase	cellobiose $\rightarrow$ céto cellobiose + $2H^+ + 2e$	15

Il convient de noter la diversité des fonctions catalytiques des différentes enzymes étudiées par électrochimie. Remarquons cependant que, quel que soit le type de réaction catalysée, ces protéines possèdent des entités reconnues efficaces dans les transferts d'électrons : groupes flaviniques et hémiques, clusters fer-soufre, complexes du cuivre. Certaines d'entre elles possèdent plusieurs de ces fonctions.

## 2. Exemples de méthodes particulièrement utiles pour l'étude du transfert

Dans la pratique, l'ensemble des méthodes électrochimiques, stationnaires, transitoires ou fréquentielles, est utilisable pour l'étude du transfert d'électrons entre le conducteur électronique et l'enzyme. Il convient cependant

de trouver les conditions expérimentales adaptées pour vérifier que l'enzyme a conservé son activité après le traitement électrochimique de réduction ou d'oxydation. De ce fait, seules quelques méthodes ont été privilégiées dans l'étude de ce problème.

La première consiste à assurer l'adsorption préalable de l'enzyme sur l'électrode et à étudier de façon voltammétrique le film obtenu [16]. La deuxième est la spectroélectrochimie en couche mince avec l'acquisition simultanée de données électrochimiques et optiques [17]. Dans les deux cas, les échantillons ne sont pas agités, les volumes nécessaires à l'expérience sont faibles et les résultats expérimentaux sont analysables sur la base de la théorie de l'électrochimie en couche mince. Les courbes intensité-potentiel présentent un maximum dont l'intensité est proportionnelle au carré du nombre d'électrons échangés, à la concentration de l'espèce électroactive et à la vitesse de balayage de l'échelle des potentiels. Symétriques dans le cas des systèmes rapides, les pics d'oxydation et de réduction sont décalés sur l'axe des potentiels dans le cas des systèmes lents, mais des valeurs des coordonnées des maximums sont très facilement déduites les coefficients de transfert anodique et cathodique et la constante intrinsèque de vitesse de transfert électronique hétérogène. La sensibilité de ces méthodes fait qu'il est possible d'estimer le nombre de molécules d'enzyme adsorbées sur l'électrode (avec une protéine d'une masse molaire de l'ordre de 100 000, le recouvrement est estimé à environ  $10^{-12}$  mol.cm<sup>-2</sup>). L'utilisation de couches minces avec des volumes de la solution de quelques dizaines de microlitres permet en outre d'effectuer des prélèvements de solution et une mesure consécutive de l'activité enzymatique. Une troisième méthode fréquemment utilisée est la voltammétrie cyclique pratiquée avec la solution enzymatique seule et la même solution renfermant des concentrations variables de substrats de l'enzyme. Il apparaît un courant catalytique dont la valeur donne une indication indirecte sur l'activité de l'enzyme. Cette méthode pose les bases du phénomène de bioélectrocatalyse (emploi simultanée d'une électrode polarisée et d'une enzyme adsorbée ou fixée en présence du substrat de l'enzyme).

## 3. Présentation de quelques résultats anciens

Les figures 1, 2 et 3 montrent quelques exemples de transferts électroniques directs mis en évidence au laboratoire il y a quelques années. La figure 1 est relative à une solution de lactate déshydrogénase extraite d'*Hansenula anomala*. Cette enzyme contient un groupe hémique et un groupe flavinique (FMN). Après une vingtaine de cycles de perturbations potentiostatiques répétitives, réalisés en présence de la solution enzymatique, les courbes intensité-potentiel montrent en oxydation deux pics caractéristiques de la flavine avec mise en évidence d'un composé intermédiaire, et un pic caractéristique du cytochrome. Des variations d'absorbance à différentes longueurs d'onde spécifiques des composés est déduit le bilan de la quantité de chacune des espèces ayant réagi à tout potentiel. Par contre, la courbe de réduction montre que toutes les espèces se réduisent au même potentiel. Le prélèvement de la solution après électrolyse permet de mesurer

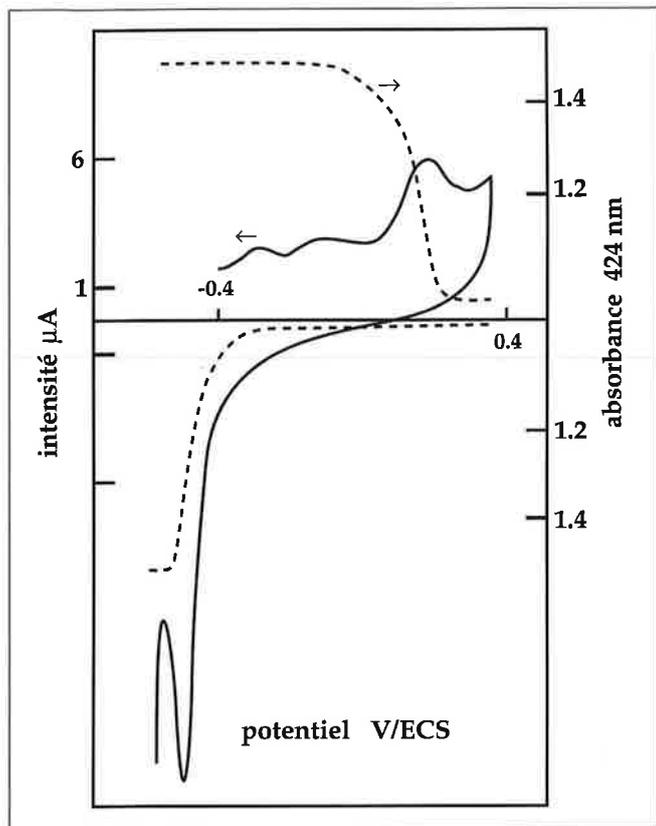


Figure 1 - Courbes intensité-potential et absorbance-potential obtenues avec une cellule en couche mince. Solution de lactate déshydrogénase et électrode de platine.

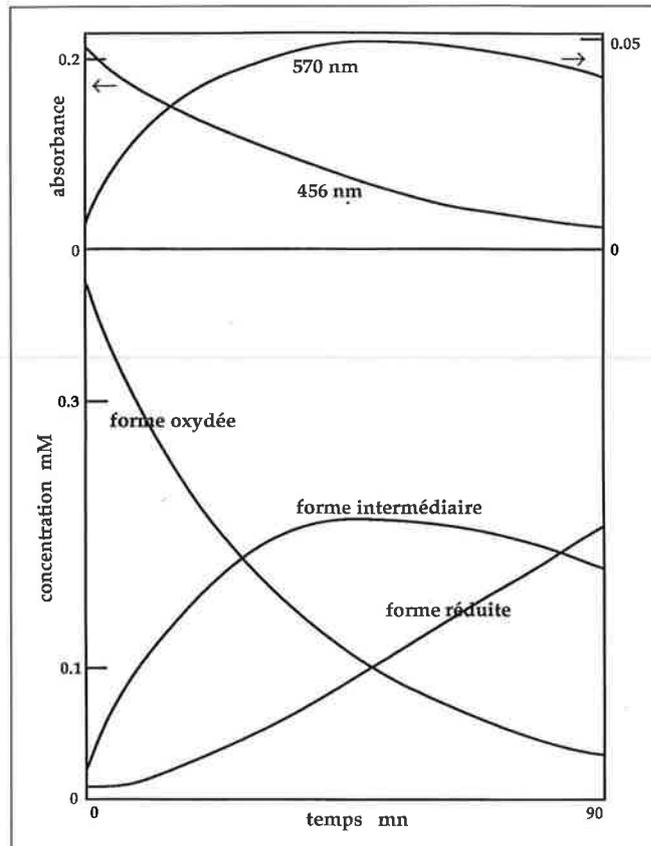


Figure 3 - Variation d'absorbance correspondant aux formes oxydée, intermédiaire et réduite d'une glucose oxydase obtenues sur électrode de platine au cours d'électrolyses à potentiel constant dans une cellule en couche mince.

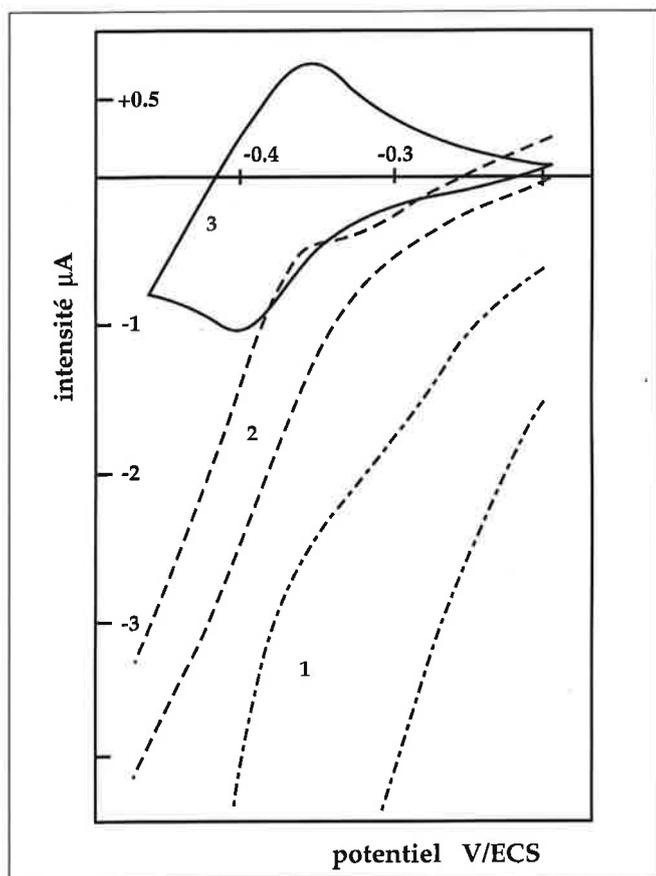


Figure 2 - Influence du traitement électrochimique préliminaire d'une électrode de platine sur le transfert électronique direct de la glucose oxydase.

l'activité enzymatique dans une réaction d'oxydation du lactate par l'hexacyanoferrate III et de conclure au maintien de l'intégrité fonctionnelle de l'enzyme. Un biocapteur électrochimique à détection ampérométrique spécifique du lactate, fonctionnant sans médiateur, utilisé notamment en médecine du sport, est la conséquence de ces observations.

La figure 2 montre l'influence du traitement électrochimique préliminaire de l'électrode de platine en contact avec une solution de glucose oxydase, sur l'évolution des courbes intensité-potential. Alors qu'au premier cycle la courbe obtenue est peu différente de la courbe de réduction du solvant, on voit progressivement apparaître des surtensions de plus en plus importantes pour la réduction du solvant, puis une courbe intensité-potential avec un maximum en réduction et un maximum en oxydation. Les quantités d'électricité permettent de déduire la concentration des molécules ayant subi la transformation électrochimique. Sur la figure 3 sont représentées les variations d'absorbance correspondant aux formes oxydée, réduite et intermédiaire d'une glucose oxydase obtenues au cours d'électrolyses à potentiels imposés, réalisées pendant l'oxydation d'une solution entièrement réduite de glucose oxydase.

Les mesures de l'activité enzymatique de la solution après réduction et réoxydation électrochimiques montrent, là encore, que l'enzyme a conservé son intégrité fonctionnelle. Le transfert électronique direct est donc possible entre le platine, rendu de plus en plus hydrophobe par le traitement électrochimique préalable, et l'enzyme, dont une première

couche est vraisemblablement très fortement adsorbée sur le métal. L'observation de l'échelle des temps indiquée sur la figure 3 montre que le transfert direct est lent et qu'il est difficile d'envisager son utilisation dans des applications analytiques.

#### 4. Les techniques actuellement utilisées pour accélérer le transfert et quelques résultats récents

La lenteur de certains transferts directs enzyme-électrode est sans doute à l'origine des nombreuses recherches dont l'objectif est d'accélérer le transfert électronique hétérogène direct. L'autoassemblage de couches de thiols ou de disulfures sur des électrodes métalliques en or, argent ou platine, la caractérisation structurales de l'assemblage moléculaire par différents moyens physico-chimiques, la fonctionnalisation du support solide, la modulation du champ électrique local par ajout d'ions non électroactifs, ont représenté pendant ces dix dernières années un champ de recherches particulièrement actif dans le domaine de l'architecture moléculaire des surfaces [18].

L'emploi de médiateurs fixés comme le ferrocène ou des complexes de l'osmium (II) et de l'osmium (III) inclus dans des films de polymères photoformés ou électroformés, s'avère particulièrement efficace dans l'augmentation des vitesses de transfert [19].

#### 5. Les tendances actuelles de la recherche

La volonté délibérée de mettre au point des biocapteurs électrochimiques à détection ampérométrique sans médiateur d'oxydo-réduction fait que de nombreuses tentatives de transfert électronique direct enzyme-conducteur électronique, sont réalisées. La plupart des études porte sur des oxydases ou des déshydrogénases possédant un équipement redox important constitué de cytochromes, de flavines, de clusters fer-soufre ou cuivre-soufre. Dans l'optique de réaliser des interfaces avec une grande concentration superficielle d'enzyme, différentes techniques de constitution de multicouches enzymatiques sont proposées. Elles consistent à modifier une première molécule d'enzyme par un antigène, une deuxième molécule d'enzyme par un anticorps et à réaliser l'assemblage grâce à la réaction antigène-anticorps [20]. L'exemple le plus étudié est celui de la glucose oxydase avec différents types de systèmes immunologiques et le

couple avidine-biotine [21]. Une deuxième tendance rencontrée dans la bibliographie est de fixer le groupe prosthétique sur l'électrode et de faire réagir l'apoenzyme sur l'électrode [22].

Enfin, quelques modifications de surface envisagées sont les mêmes que celles rencontrées lors de la mise au point de biocapteurs électrochimiques à détection ampérométrique.

#### Références

- [1] I.V. Berezin, V.A. Bogdanovskaya, S.D. Varfolomeev, M.R. Tarasevich, A.I. Yaropolov, *Doklady Phys. Chem.*, **1978**, *240*, 455 ; M.R. Tarasevich, A.I. Yaropolov, V.A. Bogdanovskaya, S.D. Varfolomeev, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1979**, *6*, 393.
- [2] J.J. Kulys, G.Y. Shvirmitkas, *Doklady Phys. Chem.*, **1979**, *245*, 208.
- [3] A.I. Yaropolov, A.A. Karyakin, I.N. Gogotov, N.A. Zorin, S.D. Varfolomeev, I.V. Berezin, *Doklady Phys. Chem.*, **1980**, *249*, 1077.
- [4] H. Durliat, M. Comtat, *Anal. Chem.*, **1982**, *54*, 856 ; **1984**, *56*, 148.
- [5] A.I. Yaropolov, A.A. Karyakin, I.N. Gogotov, N.A. Zorin, S.D. Varfolomeev, I.V. Berezin, *Doklady Phys. Chem.*, **1984**, *274*, 223.
- [6] F. Scheller, G. Strand, B. Neumann, M. Kühm, W. Ostrowski, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1979**, *6*, 117 ; R.M. Ianniello, T.J. Lindsay, A.M. Yacynych, *Anal. Chem.*, **1982**, *54*, 1098.
- [7] L.H. Guo, H.A.O. Hill, G.A. Lawrance, G.S. Sanghera, D.J. Hopper, *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *266*, 379.
- [8] W.C. Kenni, W.Mc Intire, *Biochemistry*, **1983**, *22*, 3858.
- [9] L.H. Guo, H.A.O. Hill, D.J. Hopper, G.A. Lawrance, G.S. Sanghera, *J. Biochem.*, **1990**, *265*, 1958.
- [10] J. Hirst, A. Sucheta, B.A.C. Ackrell, F.A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5031 ; A. Sucheta, B.A.C. Ackrell, B. Cochran, F.A. Armstrong, *Nature*, **1992**, *356*, 361.
- [11] A. Sucheta, R. Cammack, J. Weiner, F.A. Armstrong, *Biochemistry*, **1983**, *32*, 5455.
- [12] T. Ikeda, F. Matsushita, M. Senda, *Biosens. Bioelectron.*, **1991**, *6*, 299.
- [13] T. Ikeda, S. Miyaoka, F. Matsushita, D. Kobayashi, M. Senda, *Chem. Lett.*, **1992**, 847.
- [14] T. Ikeda, S. Miyaoka, K. Miki, *J. Electroanal. Chem.*, **1993**, *352*, 267.
- [15] T. Larsson, M. Elmgren, S.E. Lindquist, M. Tessema, L. Gorton, G. Henriksson, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, *331*, 207.
- [16] F.A. Armstrong, H.A. Heering, J. Hirst, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 169.
- [17] A.T. Hubbard, F.C. Anson, *Electroanalytical Chemistry*, Vol.4, **1970**, 130.
- [18] F.A. Armstrong, H.A.O. Hill, N.J. Walton, *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, 407.
- [19] A. Heller, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, 128.
- [20] I. Willner, E. Katz, B. Willner, *Electroanalysis*, **1997**, *9*, 965;
- [21] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.M. Savéant, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, *29*, 529.
- [22] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A.F. Buckmann, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10321.